

Exhibit 21

ANTITUMOR AGENT**Publication number:** JP63101328**Publication date:** 1988-05-06**Inventor:** UNO KATSUKO; MURAMATSU SHIGERU; KONISHI
TAKAO; TOBITAKA SHIGETADA**Applicant:** SHIONOGI & CO**Classification:****- International:** A61K35/74; A61K38/21; A61P35/00; A61K38/21;
A61K35/66; A61K38/21; A61P35/00; A61K38/21;
(IPC1-7): A61K35/74; A61K45/02**- European:****Application number:** JP19860248122 19861017**Priority number(s):** JP19860248122 19861017**Report a data error here****Abstract of JP63101328**

PURPOSE: To obtain an antitumor agent having life-prolonging effect by the immuno-activation activity to macrophage, etc., and cancer cell proliferation suppressing effect and effective on man and animal, by using treated cell of mycoplasma as an active component. **CONSTITUTION:** The objective antitumor agent contains treated cell of mycoplasma (Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma hyorhinis and/or Mycoplasma orale, etc.) as an active component. A remarkable antitumor effect can be attained by synergistic effect by adding an interferon (e.g. interferon alpha and/or interferon gamma) as the 2nd active component to the above antitumor agent. Mycoplasma can be produced according to conventional process e.g. by the stationary culture in a liquid medium produced by adding a serum of cattle, horse, pig, etc., or yeast extract to a general PPLO medium, etc., by conventional method.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-101328

⑤ Int. Cl.⁴
A 61 K 35/74
// (A 61 K 35/74
45:02)

識別記号
ADU

庁内整理番号
8615-4C

④3 公開 昭和63年(1988)5月6日

7252-4C 審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑤4 発明の名称 抗腫瘍剤

②1 特 願 昭61-248122

②2 出 願 昭61(1986)10月17日

⑦2 発 明 者	宇 野 賀 津 子	大阪府高槻市明野町28-15
⑦2 発 明 者	村 松 繁	京都府京都市左京区上高野前田町9-1
⑦2 発 明 者	小 西 喬 郎	大阪府池田市建石町10-11
⑦2 発 明 者	飛 鷹 茂 忠	滋賀県甲賀郡水口町虫生野1129-6
⑦1 出 願 人	塩野義製薬株式会社	大阪府大阪市東区道修町3丁目12番地
⑦4 代 理 人	弁理士 潮田 雄一	

明 細 書

1. 発明の名称

抗腫瘍剤

2. 特許請求の範囲

(1) マイコプラズマ菌体処理物を有効成分とする抗腫瘍剤。

(2) 該マイコプラズマが、マイコプラズマ・ガリセプティクム、マイコプラズマ・ハイオリニスおよび／またはマイコプラズマ・オラーレである特許請求の範囲第1項に記載の抗腫瘍剤。

(3) さらにインターフェロンを有効成分として含む特許請求の範囲第1項に記載の抗腫瘍剤。

(4) 該インターフェロンがインターフェロンαおよび／またはインターフェロンγである特許請求の範囲第3項に記載の抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はマイコプラズマを有効成分とする抗腫瘍剤、および、更にインターフェロンを含有する抗腫瘍剤に関する。

先行技術

種々の細菌体および菌体成分が免疫賦活物質として働き、抗腫瘍能を有することは公知の事実で、近年これを用いて腫瘍の治療を行なおうとする研究がなされている。例えば、BCG(Bacillus Calmette Guerin)菌やコリネバクテリウム・バルバム(Corynebacterium parvum)、ストレプトコッカス・ヘモリティクス(Streptococcus hemolyticus)等が代表的なものである。一方、マイコプラズマの研究の歴史は比較的新しく、近年それらの分類学的、生態学的あるいは病原学的研究が進み、動物対マイコプラズマの関係が次第に解明されつつある。マイコプラズマは一般的に宿主特異性が強く、種を越えて感染することはほとんどない。さらに、多くのマイコプラズマは病原性が比較的弱く、通常正常菌叢として健康動物から分離されることが多く、その毒性も比較的弱いと考えられる。またリンパ球に対してマイトジェニックに働くという報告もなされており(Y. Mizushima et al, Infect. Immun. Vol.50, 636-64

5, 1985) 宿主の免疫機能へ影響を与えることが予想される。

インターフェロン (IFN) は、リンパ球や線維芽細胞など種々の細胞が産生する生理活性蛋白質で、抗ウイルス作用や抗癌作用などを示す。IFN には α 、 β 、 γ のサブタイプがあり、 α は多少のアミノ酸配列の違い、それに伴う抗ウイルス作用の違いにより、さらに少なくとも14種以上に分類される。これら IFN は、近年の遺伝子組換え技術や大量細胞培養技術によって工業的に生産され、抗ウイルス剤や抗癌剤として臨床上で応用されつつある。またこれらの天然の IFN のみならず、遺伝子組換え技術によって、上記の IFN のアミノ酸配列を一部置換したり、各 IFN の配列を組み合わせるなどして、新規な人工的 IFN も生産されている。

発明が解決しようとする問題点

上記のようにマイコプラズマが免疫賦活作用を有することは良く知られていたが、癌治療に有効であるとの知見は全く得られていなかった。

ことができ、これらの種を組み合わせてもよい。

上記のようなマイコプラズマは常法に従って培養できる。すなわち、一般に用いられる培地、例えば、P P L O 培地、F r e y の培地、H a y f l i c k 培地、ハンクス液、C h a n o c k らの液体培地、ハート・インフュージョン培地などに、常法どおり牛、馬、豚、ウサギなどの血清や酵母エキスを加えた液体培地で、約 30 ~ 39 °C、好ましくは 37 °C で 2 ~ 10 日間静置培養すればよい。場合によっては、培養器にゴム栓をしたり 5 ~ 10 % 炭酸ガス雰囲気下で培養するのが好ましいこともある。培養された菌体は、遠心分離などによって分離し、生理食塩水などで洗浄し、滅菌する。得られたマイコプラズマ菌体処理物は、所望により濃縮または凍結乾燥してもよい。該菌体処理物は、冷凍保存しておくことが望ましい。

これ以外にも、マイコプラズマに感染した細胞を培養し、その培養上清からマイコプラズマを調

また、IFN とその他の抗癌剤、例えば T N F、I L 2、ダカルバジン、A C N C (商品名ニドラン) 等との併用に関しても様々な試みが成されているが、マイコプラズマ菌体処理物との併用に関する知見は全く無く、新規であり、IFN 単独投与の場合より、腫瘍治療に非常に有効な剤形を与える。

問題点を解決するための手段

本発明はマイコプラズマ菌体処理物を有効成分とする抗腫瘍剤、さらに IFN を含む抗腫瘍剤を提供する。

本発明に用い得るマイコプラズマの種としては、ガリセプチウム (gallisepticum)、ハイオリニス (hyorhinis)、オラーレ (orale)、ファーマンタンス (fermentans)、ホミニス (hominis)、ミコイデス (mycoides)、ファリンジス (pharyngis)、ニューモニエ (pneumoniae)、サリバリウム (salivarium) などが挙げられるが、これらに限定されるものではなく、免疫賦活活性を有するマイコプラズマであれば全て用いる

整してもよい。

得られたマイコプラズマ菌体処理物は、単独で投与しても著しい抗癌作用を有するが、さらに IFN を含有させて投与すれば、さらに優れた抗癌作用を示す。本発明で用いることができる IFN は特定の IFN に限らず、IFN α およびそのサブタイプ、IFN β 、IFN γ など天然または人工の IFN 全て使用可能である。ただし、IFN が種特異性を有する場合には、投与の対象に応じた IFN を使用すべきである。各種のインターフェロンは既に市販されており (例えば、LEE Biomolecular Research Laboratories, Inc などより)、これらの市販品を用いることができる。これらの IFN は単独でも組み合わせても使用できる。

得られたマイコプラズマ菌体処理物は、一般に注射剤に使用される生理食塩水、注射用蒸留水などで希釈または溶解して、ヒトおよび動物の静脈、筋肉、腹腔または皮下に投与し得る。ヒトに投与する場合は、症状、年齢、性別等によって異

なるが、通常約 $10^4 \sim 10^{11}$ 個/Kg/日の投与で効果があると考えられる。また、該製剤中にIFNを含有させ、約 $10 \sim 1000$ 万単位/日となるよう投与すれば、さらなる抗癌作用が期待できる。該注射剤には、通常製薬上許容される防腐剤、安定化剤、保存剤を含有していてもよく、また所望によりプロカイン等の局麻剤を含んでいても良い。

発明の作用

本発明の抗腫瘍剤は、マイコプラズマさらにIFNからなり、マイコプラズマのマクロファージ等に対する免疫賦活作用さらにIFNの抗腫瘍作用との相乗作用によって、優れた延命効果および癌細胞増殖抑制効果を有する。

実施例

実施例1

癌細胞(Meth A-R1株)の調製

Meth A-R1細胞はBalb/cマウス由来のメチルコランスレン誘発繊維肉腫で、マウス・インターフェロン α 、 β および γ に対する抵抗

なつてMGフリーとしたもの)を12%の割合に添加した培地(以下、馬血清添加培地とする)で、 37°C 下、2日間培養した菌液(50ml、菌数約 10^8 CFU/ml、CFU=Colony Forming Unit)を元培養菌液とした。本菌液をさらに約2Lの馬血清添加培地(3L容の3角フラスコ使用)に接種し、 37°C で7日間静置培養を行なった。この培養液を8000rpm、30分間遠心して上清を捨てた後、沈殿した菌体を生理食塩水で懸濁して、 16000 rpm、20分間遠心を行なった。この操作を3回繰り返して菌体を洗浄し、最後に100倍に濃縮した菌液約18ml(2×10^{11} 個/ml)を得た。該菌液は 120°C 20分間滅菌して、 -20°C で保存する。

マイコプラズマの調整(その2)

上記の方法で作成し、100倍に濃縮した菌液を以下の手順で凍結乾燥した。即ち、MG菌液をガラス瓶(直径3cm、高さ6cm)に3ml充填した後、凍結乾燥(真空凍結乾燥機、Freezvac-4c-100S型、東西通商株式会社製を使用)を行

性株として宇野らにより株化されたものである(K. Uno et al, 1985, Cancer Res. 45:1320-1327)。

2×10^4 個のMeth A-R1細胞をBalb/cマウスの腹腔内に移植し、10日後に腹腔より回収する。回収は、注射筒で10mlのハanks液(Hanks、日水)をマウス腹腔内に注入して、腹腔内にたまった液を再び注射筒で採取することにより行なった。回収した液は、50mlの大遠沈管(Falcon)に入れて、 1000 rpm、10分間遠心後、上清を捨て、再びハanks液に懸濁した。この細胞浮遊液を実験に使用した。

マイコプラズマの調整(その1)

マイコプラズマ・ガリセプティクム(Mycoplasma gallisepticum、S-6株;以下MGと略記)は、以下の方法で培養し、調整した。ニフトリPPL0培地(栄研製:牛心臓浸出液100g、ペプトン10g、塩化ナトリウム5g、ブドウ糖1g、酢酸タリウム0.25gを水1Lに溶解し、pH7.8としたもの)に馬血清(濾過滅菌を行

なった。MG菌が入ったサンプル瓶をドライアイス・メタノールで予備凍結(-50°C 、約20分)を行なった後、凍結乾燥機に装着し、真空度 $\times 10^{-1}$ torrで約6時間運転し、サンプルが粉状となったことを確認して、凍結乾燥を終了した。乾燥済みのサンプルは0.2mg当り 10^8 個のMG菌を含んでいた。

インターフェロンの調整

マウスに特異性を有するIFN α (180万単位含有)を生理食塩水に溶解し9mlとし、IFN α 溶液(20万単位/ml)を調整した。

マウス遺伝子組換えインターフェロン γ (以下、IFN γ と略記)は、渡部らによって確立された、Con Aで誘導されたT細胞の産生株B5株(Y. Watanabe et al, Characterization of mouse IFN γ from a cloned T cell line, in the Biology of the Interferon System, 1983 (eds. E. DeMaeyer and H. Schellekens), p.143-)からクローニングされたmRNAを用いて得られたものである。1mlの元の標品には1mgのI

FN γ 、100 μ gのマウス血清アルブミンを含んでいる。この抗ウイルス活性は 1×10^7 単位である。該IFN γ 標品0.1mlを生理食塩水に溶解し10mlとして、IFN γ 溶液(10万単位/ml)を調整した。

実験方法と結果

上記の方法で回収したMethA-R1細胞を、 4×10^6 個/mlとなるように希釈し、23G針付きの2.5ml注射筒を用いてBa1b/cマウスに1匹当たり 2×10^6 個を腹腔内に移植する。前述のMG菌(調整その1)又はその凍結乾燥品(調整その2)を1匹当たり 10^6 個を、あるいは2万単位のIFN γ または5万単位のIFN α を、それぞれ単独に投与するか、あるいはMG菌とインターフェロンを混合して投与する。

・MG溶液の調整(その1)

調整その1で得られた菌液(2×10^{11} 個/ml)2mlを生理食塩水で希釈して10ml(4×10^9 個/ml)とする。該MG溶液を等量の生理食塩水と混合した(1×10^9 個/0.5ml

1)。

・MG溶液の調整(その2)

調整その2で得られた菌凍結乾燥品(5×10^9 個/mg)8mgを生理食塩水で希釈して10ml(4×10^9 個/ml)とする。該MG溶液を等量の生理食塩水と混合した(1×10^9 個/0.5ml)。

・IFN含有MG溶液の調整

上記のIFNの調整で得られたIFN α 溶液(20万単位/ml)またはIFN γ 溶液(10万単位/ml)を等量の上記MG溶液(4×10^9 個/ml)と混合し、IFN α (5万単位/0.5ml)またはIFN γ (2.5万単位/0.5ml)とMG(1×10^9 個/0.5ml)を含む溶液を調整した。

・IFN溶液の調整

上記のIFNの調整で得られたIFN α 溶液(20万単位/ml)またはIFN γ 溶液(10万単位/ml)を等量の生理食塩水と混合し、IFN α (5万単位/0.5ml)またはIFN γ

(2.5万単位/0.5ml)を含む溶液を調整した。

投与は、3日後より隔日毎に、上記のMG及び/又はIFN γ あるいはIFN α を懸濁した液を1匹当たり0.5ml、23G針付きの2.5ml注射筒を用いてマウスの腹腔内に注入した。

Ba1b/cマウスは各群6~15匹とした。10回目のMG菌又はインターフェロンの投与が終わった後は、そのまま飼育を続け、生残状況を観察した。

試験終了時(35日)までの生残率と共に、平均生存日数を計算により求めた。平均生存日数は各固体毎の生存日数の逆数の算術平均値と偏差値を計算して、さらにその逆数とした値である。これらの結果を表1に示す。

(以下余白)

表1 MG、IFN投与によるマウスの延命効果

群	生残数/供試数(%)	平均生存日数(偏差値)
生理食塩水	0/15	13.16 (12.32~14.12)
IFN α 5万単位	0/7	15.52 (13.85~16.49)
MG 10^9 個(●)	4/7	42.9 (29.02~82.37)
MG 10^9 個(●)+IFN α 5万単位	5/7	38.2 (21.47~165.8)
MG 10^9 個(●)	3/7	41.15 (29.90~65.96)
MG 10^9 個(●)+IFN α 5万単位	4/6	59.88 (35.63~187.6)
IFN γ 2.5万単位	2/7	25.51 (19.93~35.42)
MG 10^9 個(●)+IFN γ 2.5万単位	7/7	∞

(a) 調整その1 (b) 調整その2 (c) 35日後の生残数

IFN α の5万単位の投与では十分な効果が得られなかったが、MG 10⁸個の投与で、大幅な延命効果が認められた。MG菌10⁸個とIFN α の5万単位の同時投与により、MGの単独投与よりも、さらに著しい延命効果が認められた。また、IFN γ の2.5万単位投与で、ある程度の延命効果があり、MGの10⁸個との組合わせで、全例治癒という、優れた抗腫瘍効果が得られた。

以上の結果より、MG単独投与でも延命効果があり、IFN α 又はIFN γ との組合わせによって、さらに著しい抗腫瘍効果を示すことが証明された。

実施例2

癌細胞は実施例1と同じ方法で調整した。マイコプラズマは、実施例1に記載した調整(その1)で作成したMG菌の他に、以下に記載する方法で作成したものを使用した。

マイコプラズマの調整(その3)

マイコプラズマ・ハイオライニス(Mycoplasma

hyorhinis、BIS-7株、以下MHと略記)をBHL培地(組成は以下に記載)に約10%の割合(使用した保存菌液はBHL培地で継代し、-70℃で保存していたもの)に加え、37℃で3日間培養後、さらに培地で2倍に希釈して培養し菌液20mlを得た。この菌液を、2000mlのBHL培地(3L容の3角フラスコを使用)に加え、ゴム栓をして37℃でマグネチック・スターラーで攪拌しながら培養した。培養3日後、8000rpmで30分間冷却遠心して菌体を集め、滅菌PBS(NaH₂PO₄・H₂O 0.23g、Na₂HPO₄・12H₂O 1.19g、NaCl 8.5g、蒸留水1000ml、pH6.8)で再浮游して15000rpmで20分間遠心を行った。この操作を3回繰り返して洗浄した後、120℃で20分間蒸気滅菌処理して、-20℃で保存した。該菌液の濃度は2×10⁸個/mlである。

BHL培地

BHL基礎培地 ^{a)}	750ml
豚血清 ^{b)}	100ml
馬血清 ^{b)}	100ml
25%イースト抽出液 ^{c)}	50ml
5%炭酸ナトリウムでpH7.8に修正	
a) BHL基礎培地(115℃、15分オートクレーブで滅菌)	
ブルセラ・ブロス(Gibco)	11.6g
ラクトアルブミン水解物	4.0g
塩類液(×10) [*]	100ml
蒸留水	1400ml
b) 血清(濾過滅菌済みのもの)	
豚血清(Flow Lab.)	
馬血清(阪大微研)	
c) イースト抽出液	
ドライ・イースト(ニッケン)	500g
蒸留水	1500ml
沸騰水中20分間加熱後、7000~8000rpmで20分間遠心し、その上清を4%	

水酸化ナトリウムでpH7.6とし、濾過滅菌する

* 塩類液(×10)

NaCl	80.0g
KCl	4.0g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	1.2g
KH ₂ PO ₄	0.6g
グルコース	20.0g
0.5%フェノール・レッド	40.0ml
蒸留水で1000mlとし、115℃で10分間オートクレーブで滅菌	

マイコプラズマの調整(その4)

MHあるいはマイコプラズマ・オラーレ(Mycoplasma orale)に感染したMeeth A-R1細胞2.5×10⁸個を10mlの培養液[RPMI-1640(日水)に10%牛胎児血清(ハイクローレ社)を加え、さらに炭酸水素ナトリウムを1Lにつき1.3g、HEPESを1.2g加えたもの]に懸濁し、プラスチックシャーレ(直径10cm)に入れ、これを20枚調整する。3日

間培養後、培養液を細胞と共に回収し、1000 rpmで5分間遠心して細胞を除く。さらに、その上清を3000 rpm、30分間超遠心する。上清にはマイコプラズマ由来成分が、沈渣にはマイコプラズマ菌体が含まれる。沈渣はさらに生理食塩水で3回洗った後、懸濁し菌体数を数えて120℃10分間蒸気滅菌をして、-70℃で保存した。該菌液は 10^4 個/mlの菌体を含む。

実験方法と結果

4×10^4 個/mlとなるように希釈したMeth A-R1細胞を23 G針付注射筒で、Balb/cマウスの腹腔内に、1匹当り 2×10^4 個を移植する。3日後より隔日毎に、MG[調整(その1)] 2×10^4 個、あるいはMH[調整(その3)または(その4)] 2×10^4 個を、23 G針付注射筒にて0.5 mlずつ腹腔内投与し、8日後に腹腔内の全Meth A-R1細胞数を計数した。MGまたはMHの調整は実施例1と同様に生理食塩水で希釈して調整した。

表 2

マイコプラズマによる癌細胞の増殖抑制

群	細胞数 ($\times 10^4$)
生理食塩水	640 ± 150.1
MG 2×10^4 個 ^(a)	261 ± 244.7
MH 2×10^4 個 ^(b)	199 ± 117.8
MH 2×10^4 個 ^(c)	267 ± 168.2

(a) 調整その1 (b) 調整その4 (c) 調整その3

Meth A-R1細胞の計数

脛動脈を切って放血したマウスの腹腔に、20 G針付注射筒を用いてハンクス液10 mlを注入した後、再び同じ注射筒を用いて可能な限り液を回収し、トーマ血球計算板を用いて1 ml当りの癌細胞数を計数し、ハンクス液10 ml中のマウス腹腔内の全細胞数を算出した。腹水がたまっていて回収された液が9 mlを越えるときは、回収された量に1 mlをプラスし、それに1 ml当りの癌細胞数をかけて全細胞数とした。結果を表2に示す。8日目の時点ではMG、MHの種に関係なく、また、MHの調整法に関係なく、マイコプラズマの投与によって有意にMeth A-R1細胞の増殖が抑制された。

(以下余白)

実施例 3

癌細胞(Meth A-R1)とIFN α の調整法は実施例1と同様である。マイコプラズマは実施例2に示したマイコプラズマの調整法(その4)により調整したMHとM. oraleを用いた。

実験方法と結果

Meth A-R1細胞をハンクス液で 4×10^4 個/mlに希釈懸濁し、Balb/cマウスの後足趾に25 μ l(10^4 個の細胞)ずつ、100 μ lのマイクロシリンジを用いて注射する。3日後から隔日毎に癌細胞を移植した足趾に、MH 2×10^4 個、M. orale 2×10^4 個、IFN α 1万単位を単独あるいは組み合わせて27 Gマント針付の1 ml注射筒で注入した。注入液量は50 μ lである。足趾の腫張は、ノギス(ダイヤルキャリパー)で測定した足趾の厚さで示した。計測は隔日毎に注射を行なう前に行なった。その結果を第1図に示す。ここに示したデータは6匹分の足趾厚の平均値である。実際のMeth

A-R1細胞の増殖による固型癌の大きさは、足趾厚の約3乗の値に匹敵する。

固型癌においても、MH、M. orale共に単独で有効であった。IFN α 1万単位の単独投与でも多少の効果がみられた。IFN α とMHまたはM. oraleと組み合わせて投与することにより、顕著に癌細胞の増殖が抑制された。マイコプラズマ・ガリセプチカム(MG)とIFN α 併用による安全性

安全性試験は、マウスの尾静脈内接種法を用いて実施した。試験方法は、4週令のdd δ 系マウス(雌、体重18~20g)の尾静脈に、MGとIFN α を下記の配合比率で混合したものを、1匹当たり0.4ml接種した(1群5匹使用)。接種に用いた注射筒は、1mlの注射器にルアー針1/5静脈針をセットしたものを使用した。MGとIFN α の配合比率は次の通りである。

1. MG 0.2mg + IFN α 5万単位/0.4ml/マウス
2. MG 2mg + IFN α 50万単位/0.4ml/マウス
3. MG 10mg + IFN α 250万単位/0.4ml/マウス

4. 滅菌生理食塩水 0.4ml/マウス

MG菌は、凍結乾燥(マイコプラズマの調整(その2)、 10^8 個/0.2mgを含む)したサンプルを滅菌生理食塩水に溶解して、必要濃度となるように調整して用いた。

結果：各群は、接種後12日目まで死亡するマウス及び副作用(食欲不振、立毛等)が認められなかった。

発明の効果

本発明の抗腫瘍剤は、マウスを用いた実験において、著しい延命効果および癌細胞抑制作用を示し、ヒトおよび動物に対して有効な抗腫瘍剤である。

4. 図面の簡単な説明

第1図はMeth A-R1細胞を移植したマウス足趾に、IFNおよび/またはマイコプラズマ菌体処理物を投与した際の、足趾厚の変化を示す。

出願人 塩野義製薬株式会社

代理人 弁理士 潮田 雄



第 1 図

